



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIEE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

(54) Title: NUCLEOTIDE SEQUENCES HYBRIDIZABLE WITH THE NOV GENE OF CHICKENS

(54) Titre: SEQUENCES DE NUCLEOTIDES CAPABLES DE S'HYBRIDER AVEC LE GENE NOUVEAU DANS

(57) Abstract

Nucleotide sequences containing a concatenation of nucleotides which are hybridizable in stringent conditions (50 % formamide, 5XSC) with one or more sequences of the *nov* gene of chickens, wherein the cDNA of said gene comprises the nucleotide concatenation shown in the accompanying figure. These sequences may be used as probes for detecting complementary sequences to evaluate the development and/or differentiation of tumors.

(57) Abrégé

Les séquences de nucléotides de l'invention sont caractérisées en ce qu'elles renferment un enchainement de nucléotides capable de s'hybrider, dans des conditions stringentes (50 % de formamide, 5XSC) avec une ou plusieurs séquences du gène *nov* de poule dont l'ADNc comporte l'enchainement de nucléotides représenté sur la figure. Ces séquences sont utilisables comme sondes de détection de séquences complémentaires pour l'évaluation du développement et/ou de la différentiation de tumeurs.

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Autriche	FI	Finlande	MI	Mali
AU	Australie	FR	France	MN	Mongolie
BB	Barbade	GA	Gabon	MR	Mauritanie
BE	Belgique	GB	Royaume-Uni	MW	Malawi
BF	Burkina Faso	GN	Guinée	NL	Pays-Bas
RG	Bulgarie	GR	Grèce	NO	Norvège
BJ	Bénin	HU	Hongrie	PL	Pologne
BR	Brésil	IE	Irlande	RO	Roumanie
CA	Canada	IT	Italie	RU	Fédération de Russie
CF	République Centrafricaine	JP	Japon	SD	Soudan
CC	Congo	KP	République populaire démocratique de Corée	SE	Suède
CH	Suisse	KR	République de Corée	SN	Sénégal
CI	Côte d'Ivoire	LI	Liechtenstein	SU	Union soviétique
CM	Cameroon	LK	Sri Lanka	TD	Tchad
CS	Tchécoslovaquie	LU	Luxembourg	TG	Togo
DE	Allemagne	MC	Monaco	US	Etats-Unis d'Amérique
DK	Danemark	MG	Madagascar		
ES	Espagne				

SEQUENCES DE NUCLEOTIDES, CAPABLE DE S'HYBRIDER AVEC LE GENE NOV DE POULE

L'invention a pour objet des séquences de nucléotides et les séquences d'acides aminés correspondantes. Elle concerne également l'obtention de ces séquences et leurs applications.

Il est admis depuis de nombreuses années que le néphroblastome induit par le virus auxiliaire de la myéloblastose aviaire (MAV) constitue un modèle animal de la tumeur de Wilms chez l'enfant. Bien que ces deux types de tumeurs aient des étiologies différentes, aucun virus n'ayant été associé jusqu'à présent au développement du néphroblastome humain, on conçoit que l'étude, au niveau moléculaire des néphroblastomes viro-induits, peut permettre de caractériser des paramètres difficilement accessibles dans le système humain.

Les études des inventeurs concernant de tels néphroblastomes aviaires induits par le MAV leur ont permis de caractériser chez la poule un gène embryonnaire appelé gène *nov* dont l'expression s'avère stimulée à des niveaux variables dans les tumeurs, mais qui est éteint dans les cellules de rein adulte normal.

En développant leurs travaux dans ce domaine, les inventeurs ont élaboré des outils leur permettant d'étudier l'expression de gènes homologues dans les tumeurs humaines et dans certains types cellulaires.

Ainsi, en clonant les séquences désoxyribonucléiques et un ADN complémentaire correspondant au gène *nov* des cellules normales de poule, les inventeurs ont établi la séquence nucléotidique partielle des ADN et la séquence nucléotidique complète de l'ADNc. Des sondes moléculaires spécifiques ont été établies sur la base de cette séquence

et utilisées pour détecter la présence et l'expression de gènes homologues dans divers types cellulaires humains.

L'invention a donc pour but de fournir de nouvelles séquences de nucléotides d'un gène impliqué notamment dans les cellules tumorales.

Elle a également pour but de fournir des moyens pour l'isolement de ces séquences.

L'invention vise en outre les protéines codées correspondantes et les anticorps polyclonaux et monoclonaux dirigés contre ces protéines.

L'invention vise de plus l'utilisation de ces séquences, protéines et anticorps dans des applications biologiques, en particulier dans des tests de détection.

Les séquences de nucléotides de l'invention sont caractérisées en ce qu'elles renferment un enchaînement de nucléotides capable de s'hybrider, dans des conditions stringentes (50 % de formamide 5 XSCC), avec une ou plusieurs séquences du gène nov de poule dont l'ADNC présente l'enchaînement de nucléotides (I), plus spécialement avec l'enchaînement (II).

Les enchaînements des séquences de nucléotides et de protéines auxquels il est fait référence dans la description et les revendications sont donnés en fin de description.

La séquence nucléotidique entière du clone d'ADNC nov de poule est formée de 1975 pb et comprend au moins 5 exons. Cette séquence comprend un cadre ouvert de lecture de 1,0 kb, codant pour une protéine potentielle de 32300 Da, allant du nucléotide 24 au nucléotide 1076. Ce cadre ouvert de lecture est suivi de 899 pb de séquences 3' non codantes qui contiennent deux signaux de motifs potentiels

de polyadénylation AATAAA en position 1914 et 1932. Ce gène *nov* de poule est surexprimé dans des néphroblastomes aviaires induits par MAV étudiés par les inventeurs.

Les expériences d'hybridation réalisées dans des conditions stringentes définies ci-dessus montrent que, de manière inattendue, des séquences homologues du gène *nov* de poule existent dans le génome humain.

Les séquences homologues isolées, chez l'homme ou l'animal, sont utilisables pour le criblage de banques réalisées à partir d'ARN-m, et permettent d'isoler des ADNc et ainsi d'identifier les autres exons des gènes de la même famille. Ces exons et les gènes qui les renferment, ainsi que les protéines codées correspondantes font également partie de l'invention.

On a indiqué ci-dessus que les expériences d'hybridation étaient réalisées dans des conditions stringentes, ce qui permet d'isoler des séquences présentant de fortes homologies avec celles des sondes.

Ces expériences peuvent être également réalisées dans des conditions non stringentes, en réduisant la quantité de formamide, de sel et/ou le temps de lavage, comme décrit dans "A practical guide to molecular cloning", second edition, B. Perbal, John Wiley and Sons, New York, 1988. Les séquences isolées présenteront alors une homologie moins forte que précédemment avec les séquences des sondes et conduiront à l'identification d'exons présentant moins de séquences communes.

Des séquences de nucléotides de l'invention sont plus particulièrement caractérisées en ce qu'elles comprennent ou qu'elles sont formées par un enchaînement de nucléotides capables de s'hybrider, dans les conditions stringentes évoquées ci-dessus, avec au moins une partie du

deuxième exon du gène *nov* de poule qui comprend la séquence nucléotidique (III).

Les lettres indiquées dans ces enchaînements présentent les significations conventionnelles figurant dans l'ouvrage de Perbal cité plus haut.

L'invention vise en particulier les séquences nucléotidiques comportant l'information génétique pour coder pour une protéine ayant une homologie d'environ 70 % avec le fragment de protéine, correspondant au deuxième exon du gène *nov* de poule, répondant à la séquence (IV).

Les séquences de nucléotides capables de s'hybrider avec l'enchaînement (III) ci-dessus sont également caractérisées en ce qu'elles comprennent au moins une partie d'un fragment PstI d'environ 600 pb, tel qu'obtenu à partir d'un sous-clone plasmidique, dérivé d'un clone recombinant isolé d'une banque d'ADN de placenta humain. La carte de restriction enzymatique du clone recombinant, ainsi que celle du sous-clone plasmidique dérivé renfermant la séquence nucléotidique en question, sont représentées sur la figure 2A.

De telles séquences sont caractérisées en ce qu'elles codent pour l'enchaînement d'acides aminés (V).

On notera la présence, dans ces séquences d'acides aminés rencontrées chez l'homme, d'une séquence consensus de liaison aux facteurs de croissance du type insuline (IGF). Cette séquence apparaît donc conservée chez l'homme.

Les différentes séquences évoquées ci-dessus comportent plus particulièrement au moins une partie de l'enchaînement nucléotidique (VI) suivant, correspondant au fragment Pst I mentionné plus haut, plus spécialement de l'enchaînement (VII).

L'enchaînement (VII) comporte 225 nucléotides avec 70 % d'homologie environ avec l'exon 2 du gène *nov* de poule.

D'autres séquences nucléotidiques de l'invention sont caractérisées en ce qu'elles sont formées par ou qu'elles comprennent un enchaînement de nucléotides capables de s'hybrider, dans les conditions stringentes évoquées ci-dessus, avec au moins une partie du troisième exon du gène *nov* de poule, qui comprend la séquence nucléotidique (VIII).

Des séquences du type défini ci-dessus comportent l'information génétique pour coder pour une protéine ayant une homologie d'au moins 73 % environ avec le fragment de protéine potentiel du troisième exon du gène *nov* de poule répondant à la séquence (IX).

Ces séquences sont également caractérisées en ce qu'elles comprennent au moins une partie d'un fragment PstI d'environ 800 pb et d'un fragment PstI de 2 kb, tels qu'obtenus à partir d'un sous-clone plasmidique dérivé d'un clone recombinant isolé d'une banque d'ADN de placenta humain. La carte de restriction enzymatique du clone recombinant ainsi que du sous-clone plasmidique dérivé renfermant la séquence nucléotidique en question est représentée sur la figure 2A.

Il s'agit en particulier de séquences comportant l'information génétique pour coder pour une protéine ayant la séquence (X) d'acides aminés. On observera que cette séquence d'acides aminés peut être mise en évidence chez l'homme.

Ces séquences d'acides aminés comportent plus particulièrement au moins une partie de l'enchaînement nucléotidique (XI), plus particulièrement de l'enchaînement (XII).

D'autres séquences de nucléotides de l'invention sont caractérisées en ce qu'elles comprennent ou qu'elles sont formées par un enchaînement de nucléotides capables de s'hybrider, dans les conditions stringentes évoquées ci-dessus, avec au moins une partie du quatrième exon du gène nov de poule, qui comprend la séquence nucléotidique (XIII).

L'invention vise les séquences de nucléotides comportant l'information génétique pour coder pour une protéine ayant une homologie d'environ 85 % avec le fragment de protéine correspondant au quatrième exon du gène nov de poule répondant à la séquence (XIV).

De telles séquences, capables de s'hybrider avec au moins une partie de l'enchaînement (XIII) ci-dessus, sont également caractérisées en ce qu'elles comprennent au moins une partie d'un fragment HincII d'environ 400 pb, tel qu'obtenu selon les méthodes évoquées ci-dessus pour les autres fragments de restriction (voir figure 2B).

Selon un autre aspect, ces séquences sont également caractérisées en ce qu'elles codent pour l'enchaînement d'acides aminés (XV).

Les séquences évoquées ci-dessus en rapport avec le quatrième exon du gène nov de poule comportent plus particulièrement au moins une partie de l'enchaînement nucléotidique (XVI), correspondant au fragment HincII mentionné plus haut, plus particulièrement de l'enchaînement XVII.

D'autres séquences de nucléotides encore, sont caractérisées en ce qu'elles comprennent ou qu'elles sont formées par un enchaînement de nucléotides capables de s'hybrider avec au moins une partie du premier exon du

gène nov de poule qui comprend la séquence nucléotidique XVIII.

Selon au autre aspect, de telles séquences sont caractérisées en ce qu'elles comportent l'information génétique pour coder pour une protéine ayant une homologie d'environ 30 % avec le fragment de protéine correspondant au premier exon du gène nov de poule répondant à la séquence (XIX).

De telles séquences sont également caractérisées en ce qu'elles codent pour l'enchaînement d'acides aminés (XX).

Les séquences définies ci-dessus en rapport avec le premier exon du gène nov de poule comportent plus particulièrement au moins une partie de l'enchaînement nucléotidique (XXI).

D'autres séquences nucléotidiques de l'invention sont caractérisées en ce qu'elles sont formées par, ou qu'elles comprennent, un enchaînement de nucléotides capables de s'hybrider, dans les conditions stringentes évoquées ci-dessus, avec au moins une partie des troisième et quatrième exons du gène nov de poule qui comprennent la séquence nucléotidique (XXII).

De telles séquences sont encore caractérisées en ce qu'elles codent pour un fragment de protéine répondant à l'enchaînement (XXIII) suivant d'acides aminés.

Ces séquences sont également caractérisées en ce qu'elles comprennent au moins une partie d'un fragment PstI d'environ 700 pb tel qu'obtenu selon le protocole évoqué plus haut (voir figure 2B).

Des séquences du type de celles du fragment PstI de 700 pb ci-dessus sont plus particulièrement

caractérisées en ce qu'elles sont formées par ou qu'elles comprennent un enchaînement de nucléotides capable de s'hybrider dans les conditions stringentes définies ci-dessus, avec au moins une partie du troisième exon du gène nov de poule qui comprend la séquence (XXIV).

D'autres séquences de nucléotides de l'invention comportent l'information génétique pour coder pour une protéine ayant une homologie d'au moins 60 % environ avec le fragment de protéine potentiel du troisième exon du gène nov de poule, ce fragment répondant à la séquence (XXV).

Il s'agit en particulier de séquences comportant l'information génétique pour coder pour une protéine ayant la séquence (XXVI) d'acides aminés.

On observera que cette séquence peut être mise en évidence chez l'homme. Ces séquences comportent plus particulièrement au moins une partie de l'enchaînement nucléotidique (XXVII), plus particulièrement de l'enchaînement (XXVIII).

D'autres séquences de nucléotides de l'invention sont caractérisées en ce qu'elles comprennent ou qu'elles sont formées par un enchaînement de nucléotides capables de s'hybrider, dans les conditions stringentes évoquées ci-dessus, avec au moins une partie du quatrième exon du gène nov de poule, qui comprend la séquence nucléotidique (XXIX).

L'invention vise les séquences de nucléotides comportant l'information génétique pour coder pour une protéine ayant une homologie d'environ 80 % avec le fragment de protéine correspondant au quatrième exon du gène nov de poule, ce fragment répondant à la séquence (XXX).

Il s'agit en particulier de séquences comportant l'information génétique pour coder pour une protéine ayant la séquence (XXXI).

Ces séquences sont formées par ou comprennent plus particulièrement l'enchaînement nucléotidique (XXXII).

Selon un autre aspect, l'invention vise une séquence recombinante comprenant l'une des séquences définies ci-dessus, le cas échéant associée à un promoteur capable de contrôler la transcription de la séquence et une séquence d'ADN codant pour les signaux de terminaison de la transcription.

L'invention vise également les séquences promotrices des gènes comportant les séquences nucléotidiques définies ci-dessus.

Elle vise en particulier au moins une partie de la séquence promotrice du gène nov humain dont les exons ^{un}~~deux~~, trois et quatre sont donnés sur la figure 2A. Cette séquence promotrice qui correspond à l'enchaînement (XXXII) est localisée dans un fragment PstI-Hind III de 2,2 kb et comprend les 283 nucléotides en amont au début du premier exon.

La séquence promotrice du gène nov humain est caractérisée en ce qu'elle comporte plusieurs séquences consensus de différents facteurs de transcription tels que NF1 (TGGCCTTCTGCCAATC), AP1 (TGACTAA) et Sp1 (GCCACTCCCC) .

Elle comprend également une séquence de vingt répétitions de motifs TG qui peut constituer une séquence de polymorphisme, conférant un intérêt à cette séquence comme marqueur de polymorphisme.

L'invention vise également la séquence promotrice du gène CTGF identifiée dans le fragment EcoRI - PstI de 700 pb environ, qui correspond à l'enchaînement (XXXIV).

Cette séquence est caractérisée en ce qu'elle comporte des sites de fixation des facteurs de transcription tels que SRF (CCTAAAAAGG), AP1 (TGAATCA), Sp1 (CCCGCCCC), un site potentiel de fixation à la protéine Wt1 (CGCCCCGGC) et un site NF kappa B (GAGAGCCCC). Elle comporte également une TATA base (TATAAAA).

La séquence promotrice du gène nov de poule répondant à l'enchaînement (XXXV) fait également partie de l'invention.

Cette séquence est contenue dans un fragment SmaI-XhoI d'environ 1 kb qui comporte des séquences consensus de différents facteurs de transcription ainsi qu'une TATA base. Elle est caractérisée en particulier en ce qu'elle comprend les sites suivants de fixation du facteur Sp1 : GGGGGCGGGGG, CCCCCGCCTC, Ap2 : CCGCAGGC, GGCAGGGC, GGGTCCC.

Elle comprend également un site de fixation du facteur NF kappa E2 (GGCAGGTGG) et du facteur NFKB (GGGAGTTTC).

Il est entendu que les bases des séquences de nucléotides considérées peuvent être dans un ordre différent de celui trouvé dans les gènes et/ou que ces bases peuvent être, le cas échéant, substituées. Les séquences correspondantes entrent dans le cadre de l'invention, dès lors qu'un fragment de ces séquences utilisé comme sonde donne une réponse caractéristique et non équivoque quant à la capacité de reconnaître la présence de gènes codant pour des protéines telles que définies ci-dessus exprimées dans les cellules tumorales.

L'invention vise également en tant que nouveaux produits les ARN correspondant aux différentes séquences définies ci-dessus et les séquences complémentaires des différents enchaînements nucléotidiques définis.

L'invention se rapporte également aux vecteurs recombinants de clonage et d'expression capables de transformer une cellule hôte appropriée, comportant au moins une partie d'une séquence de nucléotides telle que définie ci-dessus sous le contrôle d'éléments de régulation permettant son expression.

Les souches de microorganismes transformées ou transfectées entrent également dans le cadre de l'invention. Ces souches comportent l'une des séquences de nucléotides définies ci-dessus ou encore un vecteur recombinant tel que défini précédemment.

Elle vise également les séquences d'acides aminés correspondant, selon le code génétique universel, aux séquences de nucléotides définies plus haut, et les protéines exprimées par les gènes comportant ces séquences.

Les séquences d'acides aminés homologues à celles codées par l'exon 2, qui contiennent le site de liaison aux facteurs de croissance IGF présentent un intérêt particulier, étant donné que le gène IGFII, qui se trouve chez l'homme sur le chromosome 11p15, est surexprimé dans certaines tumeurs de Wilms et pourrait donc être impliqué dans cette pathologie.

Dès lors que le motif consensus des protéines se liant à l'IGF joue une rôle important dans le développement des néphroblastomes en conjonction avec la dérégulation de l'expression d'IGFII, on mesure l'intérêt de la détection d'une expression anormale des protéines de l'invention qui renferment un tel motif.

Les protéines de l'invention sont également caractérisées en ce qu'elles sont telles qu'obtenues par transformation de cellules hôtes au moyen d'un vecteur recombinant comme défini ci-dessus, mise en culture, dans un milieu approprié, des cellules hôtes transformées ou transfectées et récupération de la protéine à partir de ces cellules ou directement à partir du milieu de culture.

La production de ces protéines par un tel procédé fait également partie de l'invention.

Les protéines de l'invention et leurs fragments, qui peuvent être également obtenus par synthèse chimique, présentent avantageusement un degré de pureté élevé et sont utilisés pour former, selon les techniques classiques, des anticorps polyclonaux.

De tels anticorps polyclonaux, ainsi que les anticorps monoclonaux capables de reconnaître spécifiquement un épitope des protéines ci-dessus, ou d'un fragment de ces protéines, sont également visés par l'invention.

L'invention vise en outre les applications biologiques des séquences de nucléotides, des protéines correspondantes et des anticorps monoclonaux ou polyclonaux.

Ces applications comprennent l'élaboration, à partir de fragments intragéniques purifiés, ou d'ARN correspondants, de sondes moléculaires pour rechercher la présence éventuelle de séquences de nucléotides apparentées au gène *nov* dans divers types cellulaires.

L'élaboration de ces sondes comprend, notamment, la dénaturation des séquences double-brin pour obtenir une séquence monobrin.

Les essais effectués pour détecter la présence de séquences complémentaires dans diverses tumeurs et tissus humains ont mis en évidence la grande spécificité de ces fragments intragéniques.

L'utilisation de ces sondes a ainsi permis de montrer que le gène renfermant les séquences nucléotidiques définies ci-dessus est exprimé dans plusieurs types de cellules humaines, y compris certaines tumeurs du rein.

L'invention vise donc des sondes de détection caractérisées en ce qu'elles comprennent au moins une partie d'une séquence de nucléotides définie ci-dessus.

Toute sonde ne se distinguant de la précédente, au niveau de sa séquence de nucléotides, que par des substitutions ou altérations de nucléotides n'entrant pas de modification de ses propriétés d'hybridation avec le gène humain apparenté au gène *nov* de poule comme défini plus haut entre dans le cadre de l'invention.

Le fragment d'ADN utilisé comme sonde comporte un nombre de nucléotides suffisant pour obtenir la spécificité requise et la formation d'un hybride stable.

Il est possible d'utiliser des fragments atteignant plusieurs kb, des résultats de haute spécificité étant cependant également obtenus avec des fragments plus courts d'environ 25 à 40 nucléotides.

Des sondes appropriées pour ce type de détection sont avantageusement marquées par un élément radio-actif ou tout autre groupe permettant sa reconnaissance à l'état hybridé avec la préparation renfermant les nucléotides à étudier.

Selon les techniques classiques, ces sondes sont mises en contact avec l'échantillon biologique à tester ou

leurs acides nucléiques, dans des conditions autorisant l'hybridation éventuelle de la séquence de nucléotides de la sonde avec une séquence complémentaire, éventuellement contenue dans le produit étudié.

On peut, par exemple, avoir recours à la méthode d'hybridation sur taches ou à la méthode d'hybridation sur réplique, selon la technique de Southern. Dans la première méthode, selon la technique classique, on dépose une quantité aliquote d'ADN dénaturé sur des membranes de nitrocellulose. La deuxième méthode comprend la séparation électrophorétique en gel d'agarose des fragments d'ADNs engendrés après traitement de l'ADN par des enzymes de restriction, le transfert après dénaturation alcaline sur des membranes appropriées et leur hybridation avec la sonde dans les conditions usuelles.

Ces sondes constituent des marqueurs tumoraux en permettant la détection précoce de l'expression du gène renfermant lesdites séquences nucléotidiques, qui normalement n'est pas ou peu exprimé dans les tissus normaux correspondants. L'invention fournit ainsi des moyens permettant d'évaluer le développement et/ou la différentiation tumorale.

La détection pour l'identification spécifique des ADN peut être également réalisée par des techniques d'amplification de l'ADN (PCR) telles que décrites dans les brevets US 4683202 et 4683195 au nom de Cetus Corporation.

Dans ces techniques, on utilise deux amorces d'environ une quinzaine de nucléotides comprises dans l'une des séquences de nucléotides définies ci-dessus et distantes d'environ 200 à 250 nucléotides. L'une des séquences est capable de se lier à une séquence de nucléotides de l'un des brins du fragment d'ADN à amplifier et située au niveau de l'une des extrémités de ce fragment, par exemple à l'extrémité 5'. L'autre séquence est capable

de se lier à une séquence de nucléotides du deuxième brin du fragment d'ADN à amplifier, et se trouve située au niveau de l'extrémité de ce fragment opposée à celle mentionnée plus haut (à l'extrémité 3', lorsque la première se trouver à l'extrémité 5').

L'invention vise également un procédé de détection in vitro de la présence dans un échantillon biologique de séquences complémentaires de celles définies ci-dessus. Ce procédé est caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

- la mise en contact de l'échantillon biologique à étudier avec une sonde nucléotidique telle que définie plus haut dans des conditions permettant la production d'un complexe d'hybridation formé entre la sonde et la séquence de nucléotides recherchée,
- la détection du complexe d'hybridation.

Le cas échéant, on procède à une amplification préalable de la quantité de séquences de nucléotides susceptibles d'être contenues dans l'échantillon, à l'aide d'amorces, telles que décrites ci-dessus, susceptibles respectivement de se lier, d'une part à l'extrémité 5' d'un brin de ladite séquence de nucléotides et d'autre part, à l'extrémité 3' de l'autre brin de ladite séquence de nucléotides.

L'utilisation d'un tel procédé représente une augmentation de sensibilité et un gain de temps considérable par rapport aux techniques classiques qui nécessitent souvent une technologie ne pouvant être mise en œuvre que dans des services spécialisés. Il permet de plus une détection rapide et de grande spécificité des ADN et des différentes espèces d'ARNm de transcription. Ce procédé constitue un moyen de détection d'un remaniement

chromosomique au niveau des gènes qui codent pour les ARN nov ou CTGF sans avoir recours à des cultures cellulaires.

Pour la mise en oeuvre d'une telle méthode de dépistage in vitro, basée sur l'utilisation de sondes nucléotidiques, on a recours avantageusement à des nécessaires ou kits comprenant :

- une quantité déterminée d'une sonde nucléotidique selon l'invention,

- un milieu approprié à la formation d'une réaction d'hybridation entre la séquence à détecter et la sonde et, avantageusement,

- des réactifs permettant la détection des complexes d'hybridation formés entre la séquence de nucléotides et la sonde lors de la réaction d'hybridation.

- une quantité déterminée d'un anticorps polyclonal ou monoclonal selon l'invention,

- un milieu approprié à la formation d'une réaction immunologique entre au moins une partie des produits exprimés et l'anticorps et, avantageusement,

- des réactifs permettant la détection des complexes immunologiques formés lors de la réaction immunologique.

La présence dans les protéines de l'invention d'une séquence de liaison aux facteurs de croissance du type insuline (IGF) est avantageusement mise à profit selon l'invention pour le dosage des protéines. A cet effet, on met en contact les protéines de l'échantillon biologique à étudier avec un IGF comportant un groupe marqué, par exemple un groupe radioactif ou sonde froide et on effectue le dosage de la quantité de produit fixé.

On rapporte ci-après à titre d'exemples non limitatifs le clonage et le séquençage du gène *nov* de poule, et de séquences de nucléotides répondant aux définitions données plus haut. Dans ces exemples, il est fait référence aux figures 1 et 2,

- la figure 1 représentant la séquence d'ADNc du gène *nov* de poule et celle de la protéine potentielle codée
- les figures 2 A et 2 B les cartes de restriction de fragments d'ADN de l'invention

Procédés de clonage moléculaire et séquençage rapportés dans les exemples :

purification des acides nucléiques : utilisation de dichlorométhane comme décrit dans V. Maloisel et al., Met. Mol. Cell. Biol. 1, 245-247, 1990.

Southern et Northern blots, et autres procédés de clonage : effectués selon les protocoles standards publiés par B. Perbal dans "A practical guide to molecular cloning, second edition, B. Perbal John Wiley and Sons, New York, 1988

purification des fragments d'ADN BamHI-HindIII de 7 kb et SacI de 6,6 kb : méthode Geneclean (Bio 101).

Sondes radioactives : préparées par nick translation en présence d' α dCTP 32P.

Séquençage des nucléotides : selon la méthode de terminaison de chaîne au didéoxy en présence d' α dATP 35S, de T7 polymérase ou de Séquenase (USB).

Exemple 1 :

Isolement de l'ADNC du gène *nov* de poule

25 ng d'ADNC correspondant à de l'ARN poly A de fibroblastes d'embryons de poule de 13 jours sont ligaturés avec 1 µg de bras lambda gt10 pour préparer une banque d'ADNC de fibroblastes normaux de poule en utilisant le kit d'Amersham.

Après criblage avec une sonde cellulaire dérivée d'une tumeur, on purifie 7 clones, l'insert le plus long (1,9 kb) est purifié selon la méthode de Geneclean (BIO 101) et sous-cloné au site KpnI de Bluescript KS⁺ (Stratagène) pour générer le clone pC1K.

Séquençage nucléotidique :

Le séquençage est réalisé par la méthode de terminaison de chaînes didéoxy-nucléotide en présence d' α ³⁵S dATP et de polymérase T7 (Pharmacia) ou de Séquenase dans les conditions décrites par les fabricants.

Des matrices sont obtenues à partir des clones recombinants M13mp18 et M13mp19. Les amorces de séquençage proviennent de Biolabs, New England. Les compressions GC sont résolues en utilisant la déoxy-inosine (USB).

Caractérisation du gène cellulaire *nov* :

On effectue une analyse par Northern Blot d'ARN isolés de reins normaux, de fibroblastes d'embryons de poule (FEP) et de néphroblastomes en utilisant les sondes cellulaires dérivées d'une tumeur. La sonde HX1024 permet de détecter dans les FEP normaux une espèce d'ARNm de 2,2 kb dont l'expression est altérée dans tous les autres néphroblastomes. Le criblage d'une banque d'ADNC de FEP permet d'isoler un clone d'ADNC de 1,9 kb représentant l'ARNm de 2,2 kb exprimé dans les FEP normaux.

On a représenté sur la figure 1 la séquence entière nucléotidique de 1975 pb du clone d'ADNC de ce nouveau gène, surexprimé dans les néphroblastomes étudiés, appelé gène nov. Ce gène apparaît constitué de 5 exons. Un cadre ouvert de lecture de 1,0 kb codant pour une protéine potentielle de 32300 Da a été identifié du nucléotide 24 au nucléotide 1076. Ce cadre ouvert de lecture est suivi de 899 pb de séquences 3' non codantes qui contiennent deux motifs potentiels de signaux de polyadénylation (AATAAA) aux positions 1914 et 1932.

On a également indiqué sur cette figure les acides aminés potentiellement codés. Le polypeptide nov potentiel contient un noyau hydrophobe caractéristique d'un signal peptidique à son extrémité amino (avec 6 leucines). Cette protéine nov étant dépourvue d'autres régions hydrophobes présentes dans les protéines trans-membranaires, il est vraisemblable qu'elle est sécrétée. La protéine nov contient également le motif consensus GCGCCXXC des protéines liant les facteurs de croissance du type insuline (IGF) et un total de 39 résidus cystéine ne formant pas de cluster.

Exemple 2 : Isolement dans des cellules humaines de séquences de nucléotides apparentées au gène nov de poule.

On effectue un Southern blot de fragments d'ADN humain digéré par EcoRI avec le clone d'ADNC du gène nov de poule pC1K. On opère dans les conditions stringentes rapportées par B. Perbal (voir référence ci-dessus).

On constate que quatre fragments EcoRI s'hybrident avec des séquences du gène nov de poule. Ces fragments comportent respectivement 15, 12, 8 et 5,6 kb.

Exemple 3 : Isolement de séquences de nucléotides apparentées au gène nov de poule.

A partir d'une banque d'ADN de placenta humain, on isole à l'aide de la sonde pC1K radiomarquée deux groupes de clones lambda gt11 recombinants.

La carte de restriction partielle de lambda Hu92 (qui correspond à trois clones se chevauchant) et de lambda Hu93 (qui correspond à deux clones se chevauchant) et celles des sous-clones plasmidiques pBH7 et p56 sont représentées sur les figures 2A et 2B.

Les séquences de nucléotides humaines homologues à celles du gène *nov* de poule sont localisées dans un fragment d'ADN de 7,0 kb BamHI-HindIII du clone Hu92 et celles appartenant au gène CTGF dans un fragment d'ADN de 6,6 kb SacI du clone Hu93.

Sur ces cartes, les enzymes de restriction sont désignées comme suit : B = BglII, P = PstI, K = KpnI, H = HindIII, S = SacI, E = EcoRI, X = Xba, B = BamHI et Hc = Hinc II. Les blocs noirs représentent les régions exoniques humaines.

Le sous-clonage de ces fragments dans les vecteurs pUC18 et pUC19, appelés respectivement clones pBH7 et pS6 permet de localiser plus précisément les séquences homologues du gène *nov* de poule et les séquences du gène du CTGF. Les premières sont localisées d'une part dans un fragment d'ADN PstI de 600 pb (E2), d'autre part dans un fragment PstI de 800 pb (E3), et dans un fragment HincII de 400 pb (E4). La sonde pBH7 correspond au fragment HindIII-BamHI.

La localisation des premier, deuxième, troisième, quatrième et cinquième exons humains au GTGF sont indiquées sur la figure 2B (désignations respectives E1, E2, E3, E4, et E5).

L'utilisation des fragments PstI d'ADN purifiés comme sondes dans des expériences d'hybridation Southern avec les fragments EcoRI de l'exemple 2 conduit à la seule détection du fragment EcoRI d'ADN de 12 kb avec PB06 et du fragment EcoRI de 15 kb avec PSP07 démontrant que les séquences de PBP06 et PSP07 correspondent à un sous-ensemble des exons *nov* de l'ADNC de poule.

Exemple 4 : Détection d'ARN du génome humain apparentés au gène *nov* de poule.

On rapporte dans le tableau suivant les résultats d'expériences d'hybridation Northern avec différents tissus et lignées cellulaires en utilisant comme sondes les enchaînements de formule VIII, XV et XVI ci-dessus homologues respectivement des exons E2, du gène *nov* de poule et E3 et E4 du gène CTGF (ces codes étant utilisés dans le tableau pour les désigner).

TISSUS ET LIGNEES CELLULAIRES	SONDES		
	E2 (nov)	E3-E4 (CTGF)	kb de l'ARNm
Moelle osseuse	+	+	(2,)
thymus (foetal)	+	-	(2,5) (7,4)
Foie (foetal)	-	-	(2,5)
HEL	-	+	(2,5)
Cerveau (foetal)	+	-	(2,5)
	-	+	(7,4)
Neuroblastome 1	+	+	(2,5)
Neuroblastome 162	+	+	(2,5)
	-	+	(7,4)
Rein (foetal)	+	+	(2,5)
Nephroblastome Bou	nt	+	(2,5)
Tissu mammaire	nt	+	(2,5)
Tumeur mammaire gg	nt	+	(2,5)
Tumeur mammaire sc	nt	+	(2,5)
	+	+	(3,5)
	-	+	(7,4)
SK-BR3	-	+	(2,5)
	+	+	(3,5)
	-	+	(7,4)

poumon (foetal)	+	+	(2,5)
coeur (foetal)	+	+	(2,5)
lignée 293	+	+	(2,5)
MCF7	-	+	(7,4)
Carcinome embry test. 8	nt	+	(2,7)
	-	+	(7,4)
Teratocarcinome test. 10	nt	+	(2,7)
	-	+	(7,4)
Teratocarcinome test. 11	nt	+	(2,7)
	-	+	(7,4)
Adenocarcinome U377	nt	+	(2,7)
	-	+	(7,4)
HL60	nt	+	(7,4)

nt = non testé

Les résultats obtenus montrent que le gène humain homologue du gène *nov* de poule et le gène CTGF appartenant à la même famille sont exprimés selon les tissus ou lignées sous la forme de différentes espèces d'ARN détectés soit par les deux sondes, soit par une seule d'entre elles.

L'espèce d'ARNm de 7,4 kb exprimée par certains tissus et lignées n'apparaît reconnue que par la sonde PSP07.

Ces résultats indiquent que la régulation des gènes chez l'homme dépendrait de la spécificité tissulaire.

ENCHAINEMENT I

ENCHAINEMENT II

ENCHAINEMENT III

101	AGGTGAGCGG	111	GCGGGAGGG	121	GCGTGC	131	GGCCCTGCC	141	GGCCGCTGC	151
161	CGCCGGCTG	171	CGCCCCGGGA	181	GTGCCCGCCG	191	TGCTGGACGG	201	CTGGGCTGC	211
221	GCGCCGGCA	231	GCGCGGGGAG	241	AGCTGCTCCC	251	CTCTGCTGCC	261	CTGCGACGAG	271
281	TCTACTGCGA	291	CCGGGGCCCC	301	GAGGACGGCG	311	GCGGCCGG	321	CATCTGCATG	

ENCHAINEMENT IV

33	VSGREAAACPR	43	PCGGRCPAEP	53	PRCAPGVPAV	63	LDGGCCCLVC	73	ARQRGESCSPL	83
93	YCDRGPEDGG		GAGICM						LLPCDESSGL	

ENCHAÎNEMENT V											
756	V	A	A	T	Q	R	C	P	P	Q	C
					771					786	
801	P	A	T	P	P	T	C	A	P	G	V
					816					831	
846	D	G	C	S	C	C	L	V	C	A	R
					861					876	
891	S	C	S	D	L	E	P	C	D	E	S
					906					921	
C	D	R	S	A	D	P	S	N	Q	T	G
											I
											C
											T

ENCHAINEMENT VI

355	365	375	385	395	405
CTGCCAA	CGGGCTGTG	CGGTCCCCAG	GAGGGCTA	TAACCTGT	GCTGGCGTG
415	425	435	445	455	465
ATCGGCAAGC	ACCGGACCA	GGGAAGGG	AGCAAGCCA	ATCTACAGCG	AAGAAAGTCT
475	485	495	505	515	525
CGTTGGTAA	AAGCGAGGG	GGAAAGCCTG	AGCATGGAGA	GTGTGCAGAG	CACGAGCTTT
535	545	555	565	575	585
TGTCTCGGA	AGGCAAGTGGC	TTTGCCTGAC	CTTCCTGGCTT	CTCCCATCTCC	TGGGACAGTA
595	605	615	625	635	645
AGTGGCACAC	CCTTAAGATG	CCCCAAAGT	TACTTGGCC	GCCTTGGTGG	CCCCCATTG
655	665	675	685	695	705
GTCACCGGGC	TCACTGGTC	TTCTGTCCCCA	GCTGAGTGGT	TTCTCTCTTGT	CTCGCCTGCC
715	725	735	745	755	765
TTCAGGTGCG	TGCCACTCAG	CGCTGCCCTC	CCCAGTGGCC	GGGGCGGTGC	CCTGCCAGCC
775	785	795	805	815	825
CGCCGACCTG	CGCCCCGGG	GTGCCGGGG	TGCTGGACGG	CTGCTCATGC	TGTCTGGTGT
835	845	855	865	875	885
GTGCCCGCCA	GGTGGCGAG	AGCTGCTCAG	ATCTGGAGCC	ATGGGACCGAG	AGCAGTGGCC
895	905	915	925	935	945
TCTACTGTGA	TGGCAGGGCG	GACCCAGCA	ACCAAGACTGG	CATCTGCACG	GGTAATCCTG
955	965	975			
CTCCCTCTGC	TGTTGACCT	CTTCTCCTGC	AG		

ENCHAÎNEMENT VII

720 730 740 750 760 770
 GTCGCTGGAA CTCAGGGCTG CCCTCCCCAG TGCCCGGGCC GGTGCCCTGC GACGCCGCCG

780 790 800 810 820 830
 ACCTGCGCCC CCCGGGTGCG CGCGGTGCTG GACGGCTGCT CATGGCTGTCT GGTGTGTGCC

840 850 860 870 880 890
 CGCCAGGGTG GCGAGAGGCTG CTCAGATCTG GAGCCATGCC ACAGAGGAG AGGAGGAG TGGCCTCTAC

900 910 920 930
 TGTGATGGCA GCGGGGACCC CAGCAACCAG ACTGGCATCT GCACGG

ENCHAÎNEMENT VIII

331 341 351 361 371 381
 GTGCTGGAAG GGGACAACTG CGTGTTCGAT GGGATGATT ACCGCAACGG GGAGACGTTTC

391 401 411 421 431 441
 CAGCCCCAGCT GCAAGTACCA GTGCACCTGC CGGGACGGGC AGATCGGTG CCTGCCCGC

451 461 471 481 491 501
 TGCACCTGG GCCTGCTGCT CCCGGCCCC GACTGCCCT TCCCGGGAA GATCGAAGTC

511 521 531 541 551 561
 CCCGGAGGT GCTGGAGAA GTGGGTGTGC GACCCCAGGG ATGAAAGTGGCT CCTGGGAGGC

571
 TTGCTATGG CT

ENCHAINEMENT IX

109	119	129	139	149	159
VLEGDNCVFD	GMIYRNGETF	QPSCKYQCTC	RDGQIGCLPR	CNLGLLPGP	DCPFPRKIEV
169	179				
PGECCCEKWC	DPRDEVLLGG	FAMA			

ENCHAINEMENT X

116	131	146			
GCG	GTA	GAG	GGG	GAT	AAC
A	V	E	G	D	N
161	176		C	V	F
AGT	GGA	GAG	AAA	TTT	CAG
S	G	E	K	F	Q
206	221		P	S	C
AGA	GAT	GGG	CAG	ATT	GGC
R	D	G	Q	I	G
251	266		C	V	P
CTA	CTG	CCT	GAG	CCT	AAC
L	L	P	E	P	N
296	311		C	P	A
CCT	GGA	GAG	TGC	TGT	GTC
P	G	E	C	C	E
341			K	W	I
GAT	TCA	CTG	GGA	GGC	CTT
D	S	L	G	G	L
			T	T	A

ENCHAINEMENT XI

10	AAAAGGACTT	GGGTTTGGAA	ACATGCCCTC	CAAATCTTAC	ATAGCTTCTT	CACTGTATG	60
70	TGTTCTTGT	TTTCCTCTTC	CTCTTGGCTT	TTCACTTTGC	TTCCCCAATA	TTCTAGCGGT	
130	AGAGGGAGAT	AACTGTGTGT	TCGATGGGGT	CATCTACCGC	AGTGGAGAGA	AATTTCAGCC	
190	AAGCTGCAA	TTCCAGTGCA	CCTGCAGAGA	TGGCAGATT	GGCTGTGTGC	CCCGCTGTCA	
250	GCTGGATGTG	CTACTGCCTG	AGCCTAACTG	CCCAGCTCCA	AGAAAAGTGTG	AGGTGCCTGG	240
310	AGAGTGTGT	GAAAAGTGGAA	TCTGTGGCCC	AGATGAGGAG	GATTCACTGG	GAGGCCTTAC	300
370	CCTTGCAGGT	GAGAAACTCA	ATATAACCTAG	GGCTGGTCAT	AGTAGAGGGT	AAATACAAAC	360
430	ATGAAGAATT	TGCAATCTCT	TGGATTGAA	AA			420

ENCHAINEMENT XII

125	GCGGTAGAGG	GAGATAACTG	TGTGTTCGAT	GGGGTCATCT	ACCGCAGTGG	165	175
185	CAGCCAAGCT	GCAAATTCCA	GTGCACCTGC	AGAGATGGGC	AGATTGGCTG	225	235
245	TGTCAGCTGG	ATGTGCTACT	GCCTGAGCCT	AACTGCCAG	CTCCAAGAAA	AGTTGAGGTG	
305	CCTGGAGAGT	GCTGTGAAA	GTGGATCTGT	GGCCCAGATG	AGGAGGATTC	ACTGGAGGC	295
365	CTTACCCCTTG	CAG					

ENCHAINEMENT XIII

583	GCATACAGAC	AGGAGGCCAC	ACTTGGGATA	GACGTGTCTG	ATTCAAGTGC	623	633
643	GAACAGACAA	CAGAATGGAG	TGCTTGTTC	AAAAGCTGTG	GAATGGGCTT	TTCTACCCGT	
703	GTTACCAACA	GAAATCAGCA	GTGTGAGATG	GTGAAGCAGA	CACGACTTTG	CATGATGAGA	753
763	CCTTGTGAAA	ACGAAGAGGCC	ATCTGATAA				

ENCHAÎNEMENT XIV

193 203 213 223 233 243
 AYRQEATLGI DVSDSSANCI EQTTEWSACS KSCGMGFSTR VTNRNQQCEM VKQTRILCMMR

253
 PCENEPEPSDK

ENCHAÎNEMENT XV

104 119 134
 GCT TAC AGG CCA GAA GCC ACC CTA GGA GTA GAA GTC TCT GAC TCA
 A Y R P E A T L G V E V S D S
 149 164 179
 AGT GTC AAC TGC ATT GAA CAG ACC ACA GAG TGG ACA GCA TGC TCC
 S V N C I E Q T T E W T A C S
 194 209 224
 AAG AGC TGT GGT ATG GGG TTC TCC ACC CGG GTC ACC AAT AGG AAC
 K S C G M G F S T R V T N R N
 239 254 269
 CGT CAA TGT GAG ATG CTG AAA CAG ACT CGG CTC TGC ATG GTG CGG
 R Q C E M L K Q T R L C M V R
 284 299
 CCC TGT GAA CAA GAG CCA GAG CAG CCA ACA GAT TAG
 P C E Q E P E Q P T D K

ENCHEAINEMENT XVI

10	20	30	40	50	60
ATCAGAGTCG	AATGAGACCC	AGTTCTAAT	AATGGCTGAA	AAGGACCACT	TTCCAATCCT
70	80	90	100	110	120
CACATTGATC	CTAATATGGC	TGTCTTTATT	TATACATCCC	ATAGCTTACA	GGCCAGAAGC
130	140	150	160	170	180
CACCCCTAGGA	GTAGGAAGTCT	CTGACTCAAG	TGTCAACTGC	ATTGAAACAGA	CCACAGAGTG
190	200	210	220	230	240
GACAGCATGC	TCCAAGAGCT	GTGGTATGGG	GTTCCTCCACC	CGGGTCACCA	ATAGGAAACCG
250	260	270	280	290	300
TCAATGTGAG	ATGCTGAAAC	AGACTCGGGCT	CTGCATGGTG	CGGCCCTGTG	AACAAAGAGCC
310	320	330	340	350	360
AGAGCAGCCA	ACAGATAAGG	TAGGAGCCTG	GAGGAAACCT	CCCATCCTGA	AGGTAATGGC
370	380	390	400	410	420
CTTGTGCTCT	TGGAGCCTGG	GCTTCAGAAA	GTCACTGTG	CACTCTGTGA	CGGAGAGAGC
430	440	450	460	470	480
AGCTATAGCG	GGGAG				

ENCAILLEMENT XVII

113	123	133	143	153	163
GCTTACAGGC	CAGAAGGCCAC	CCTAGGGAGTA	GAAGTCTCTG	ACTCAAGTGT	CAACTGCATT
173	183	193	203	213	223
GAAACGACCA	CAGAGTGGAC	AGCATGCTCC	AAGAGCTGTG	GTATGGGGTT	CTCCACCCGG
233	243	253	263	273	283
GTCACCAATA	GGAAACCGTCA	ATGTGAGATG	CTGAAACAGA	CTCGGCTCTG	CATGGTGCAG
293	303	313			
CCCTGTGAAC	AAGAGGCCAGA	GCAGGCCAACAA	GATAAG		

ENCHAINEMENT XVIII

TATGGAGACG GGGGGGGGC AGGGGCTGCC CGTCCTGCTG CTGCTCCTGCG 83
33 43 53 63 73

GGCGTGGCA

ENCHAINEMENT XIX

10 20
 METGGQQGLP VLLLLLLLR PCE

ENCHAINEMENT XX

285 300 315
 ATG GCA ACC CCG GGG TTC GTT CCA CTT CCC CAC CCA GCC GAT CTC
 M A T P G F V P L P H P A D L
 330 345
 CCC CCT CCT CCC TGC ACT GCA GCC AAC CGG CTT
 P P P C T A A N R L

ENCHAINEMENT XXI

294 304 314 324 334 344
 ATGGCAACCC CGGGTTCGT TCCACTTCCC CACCCAGCCG ATCTCCCCC TCCTCCCTGC
 354
 ACTGCAGCCA ACCGGCTT

ENCHAÎNEMENT XXII

AAC CGG GAG ACG TTC CAG CCC AGC TGC AAG TAC CAG TGC ACC TGC CAG CAC AAC TGC CGG CAG ATC GGG TGC CTC CCC CGC TGC CCC CGC TGC AAC CTC GCC CTC CTC CCC CGC CCC TGC CGG CGG AAG ATC GAA GTC CCC GGA GAG TGC TGC GAG AAG TGC GTG TGC GAC CCC AGG GAT GAA GTG CTC CTC GCA GGC TTT GCT ATG GCT GCA TAC AGA CAG GAG GCC ACA CTT GGG ATA GAC GTG TCT GAT TCA AGT GCC ATG TGT ATT GAA CAG ACA ACA GAA TGG ATG GCT TGT TCC AAA AGC TGT GGA ATG GGC TTT TCT ACC CGT GTT ACC AAC AGA AAT CAG CAG TGT GAG ATG GTG AAG CAG ACA CGA CTT TGC ATG ATG CCT TGT GAA AAC GAA GAG CCA TCT GAT AAG

ENCHAINEMENT XXIII

Q	I	P	T	R	I	P	D	A	L	D	V	R	V	P
48					63					78				
93	Q	C	L	T	S	A	S	P	T	P	L	F	P	S
						108					123			S
138	S	P	A	K	D	G	A	P	C	I	F	G	G	T
						153					168			V
183	Y	R	S	G	E	S	F	Q	S	S	C	K	Y	Q
						198					213			C
228	T	C	L	D	G	A	V	G	C	M	P	L	C	S
						243					258			M
273	D	V	R	L	P	S	P	D	C	P	F	P	R	R
						288					303			V
318	K	L	P	G	K	C	C	E	E	W	V	C	D	E
						333					346			P
363	K	D	Q	T	V	L	G	P	A	S	R	V	S	R
						378					393			V
408	F	L	*	V	R	V	V	I	L	S	Q	G	G	S
						423					438			P
453	N	C	A	D	R	T	G	E	I	P	Y	P	G	V
						468					483			D
498	H	G	V	C	V	L	C	S	R	S	L	P	T	G
						513					528			R
543	H	V	W	P	R	P	N	Y	D	*	S	Q	L	P
						558					573			G
588	P	D	T	E	W	S	A	C	S	K	T	C	G	M
						603								G
	Y	S	T	R	V	T	N	D	N	A				

ENCHAINEMENT XXIV

CTGGCGTGTTCGATGGGATGGGATTACCGAACGGGAGACGTTCCAGGCCAGGCTGCCAGTACCAAGTGACCC
 350 360 370 380 390 400
 190 200 210 220 230 240 250
 TGCCGGGACGGGAGATCGGGTGCCTGCCCGCTGCAACCTGGCCTGCTGCTCCCCGGCCGACTGCC
 420 430 440 450 460 470
 CCTTCCCCGGAAAGATCGAAG-TCCCGGGAGAGTGTGGTGTGGAGAAAGTGGGTGTGGCAC
 490 500 510 520 530

ENCHAINEMENT XXV

EGDNCSVFDGMIYRNGETFQPSCKYQCTCRDGQIGGCLPRCNLGLLPGPDCPFPRKIEVPGECCCEKW
 110 120 130 140 150 160
 VCD-PR
 170

ENCHAINEMENT XXVI

40 50 60 70 80 90 100
 DGAPCIFGGTVYRSGESFQSSCKYQCTCLDGAVGCMPLCSMDVRLPSPDCPFPRRVKLPGKCCCEEWVCDE
 PR

ENCHAISEMENT XXVII

		1
		CC
5	3	18
		33
	CAG ATC CCA ACT CGC ATC CCT GAC GCT CTG GAT GTG AGA GTG CCC	
48	63	78
	CAA TGC CTG ACC TCT GCA TCC CCC ACC CCT CTC TTC CCT TCC TCT	
10	93	108
	TCT CCA GCC AAA GAT GGT GCT CCC TGC ATC TTC GGT GGT ACG GTG	
	138	153
	TAC CGC AGC GGA GAG TCC TTC CAG AGC AGC TGC AAG TAC CAC TGC	
	183	198
	ACG TGC CTG GAC GGG GCG GTG GGC TGC ATG CCC CTG TGC AGC ATG	
15	228	243
	GAC GTT CGT CTG CCC AGC CCT GAC TGC CCC TTC CCG AGG AGG GTC	
	273	288
	AAG CTG CCC GGG AAA TGC TGC GAG GAG TGG GTG TGT GAC GAG CCC	
	318	333
	AAG GAC CAA ACC GTC CTT GGG CCT GCC TCG CGG GTG AGT CGA GTC	
	363	378
20	TTC CTC TAA GTC AGG GTC GTG ATT CTC TCC CAG GGA GGG AGT CCT	
	408	423
	AAC TGT GCC GAC CGA ACG GGG GAA ATA CCT TAT CCA GGC GTT TTA	
	453	468
	CAT GGT GTT TGT GTG CTC TGC TCT CGC AGC TTA CCG ACT GGA AGA	
25	498	513
	CAC GTT TGG CCC AGA CCC AAC TAT GAT TAG AGC CAA CTG CCT GGT	
	543	558
	CCA GAC ACA GAG TGG AGC GCC TGT TCC AAG ACC TGT GGG ATG GGC	
	588	603
	ATC TCC ACC CGG GTT ACC AAT GAC AAC GCC TC	

ENCHAINEMENT XXVIII

35 190 200 210 220 230 240 250
 TGCCTGGTCAGACA-CAGAGTGGAGCCCTGTTCCAAGAACCTGTGGATGGCATCTCCACCCGGTTA
 260
 CCAA

ENCHAINEMENT XXXIX

GCTTTGCTATGGCTGATACAGACAGGAGGCCACACTTGGGATAGACGTTGCTT-GATTCAAGTGCCAAT
 570 580 590 600 610 620
 TGTATTGAAACAGACAACAGAAATGGAGTGCCTTGTCCAAAAGCTGTGGAAATGGGCTTTCTACCCGGTTA
 630 640 650 660 670 680 690
 CCAA

ENCHAINEMENT XXXI

TEWSACSKTCCMGISTRVTNDN
 70 80
 TEWSACSKTCCMGISTRVTNDN
 210 220

ENCHAINEMENT XXXII

130 140 150 160 170 180
 CTGGCTCTCGCAGCTTACCGACTGGAAAGACACGTTGGCCAGACCCAACTATGATT-A-GAGCCAAC
 0 200 210 220 230 240 250
 CTGGTCCAGACA-CAGAGTGGAGCCCTGTTCCAAGAACCTGTGGGATGGCATCTCCACCCGGTTA

ENCHAIEMENT XXXIII : fragment 1

10	20	30	40	50	60
GCTTCTTT	TAAGAACAG	TCTTCTTC	CCAAGAAC	TGCTCTTCT	CTCCATTCCA
70	80	90	100	110	120
ACCATGAGGT	TCTAACTAAT	CCCCATACTT	CACCTCCCT	GTCCTCATG	ATTAGTCCAG
130	140	150	160	170	180
GGTGAACCCA	TCCAATTAA	TTCCTGGAAC	TTTAAAGTT	GGCCTAAGA	GACAGGGACA
190	200	210	220	230	240
TTCCTCTGT	GGTGATAAGG	TCATAAAGTA	AGAAGATTGG	AAGGATCATT	TTTCCCTTAT
250	260	270	280	290	300
GTGGAAGTAA	TCCTGTTGGC	CCTCCCTCT	CTAGATCCCA	ATGCCTCTG	AGGAECTCCCT
310	320	330	340	350	360
GTACCAATTCC	TGTGCTGTCA	CTATGTGAAA	CATCACAGCA	TCCTCCAGT	AAAGTCCTCT
370	380	390	400	410	420
TTTCGCAAAA	ACTAGTTCAA	GTTGGTTTC	CATCTCTGC	AATCAAAACT	GAATAGCAAT
430	440	450	460	470	480
TTTACACTTG	CAGTGACTTC	TTGACATGTT	AATCCTGTC	TTAAAGTTAC	ATTTCCCTG
490	500	510	520	530	540
TCACCACTCC	ACCCCCACTC	TTTCCAAGAA	GAGCTAGGGCC	AATCTCCATG	TGCCAATT
550	560	570	580	590	600
CTCCTTGTTC	TATCTGAGTC	TATTCATGCT	TGGAACACTT	GGCCGATGCT	CTTGGCTCC

ENCHAINEMENT XXXIII : fragment 1 (suite)

610	620	630	640	650	660
CCATTAGCAG	TGCTTCTAGT	TGCTCCATT	CAAAGTACAT	TAAATGCTG	TCTACCAAGA
670	680	690	700	710	720
GCCGCCCA GAGAATCCA CTGAGTGGGT CAAGACTGGG GCTCAGGAAT CTGTATT					
730	740	750	760	770	780
ACACAAATAC	ATGCTGGTGTG	ATTCGATCTG	CAGCCAGATG	GAGGCATCAT	TAGGCCAAAT
790	800	810	820	830	840
GGCTTACAAA	ACCTATCAGT	TTTTTGTGTT	TTTGTGTTAT	CTTTTCTTA	AACTTTTAT
850	860	870	880	890	900
TCAAGTTAG	GGGAAATGTC	CAGGTTGTT	TACACAGGAA	ATGTGTCA	GACATTGTT
910	920	930	940		
G'GCAGATTAA TTTCATCGCC CAGGTATTA GCCTGGTACCGAGGTAC					

ENCHAINEMENT XXXIII : fragment 2

10	20	30	40	50	60
CATTAGTTAT	TTTCCCCGAT	CTTCTCCCGAT	CTCCCCCCT	CCACCCCTCCA	AAGCCTATCA
70	80	90	100	110	120
ATTGAAGAG	TAGGTAAATG	TCCTACTCAA	GAGTGCAAAT	GAAGTGTTC	ATCTCTAGTT
130	140	150	160	170	180
AAGTTTGAGT	ACTACTCAGT	CTCATTAC	TCAAAGAAAG	CAGAACTATT	AGAGGCTTGG
190	200	210	220	230	240
AAGTGTGTC	TAGGGGTTTC	AGGCTGCCGA	GAGAATTATC	TAGAAGGGGC	TGAGGGTGA
250	260	270	280	290	300
CTCATCATCT	GGGGGTGTTG	CAGAGGCAGA	CCTGGCCCT	TCCGCAAGCT	GCCTTGTGATT
310	320	330	340	350	360
TCCTTCATGC	TGGGACAGA	TGAGGTAGAG	GCCATTGTT	TCTTTTAA	CTCTAGAATT
370	380	390	400	410	420
ACATCACAGG	CCTGTATAAT	TTTCCCTAAA	AAGTGTTTT	TGTTTTTTC	CAAAGCAACT
430	440	450	460	470	480
ATCCCTCAAA	GAGCTGGCA	TAGTTCTCCCT	AGGGGAGCA	CCAGTGTGA	AGTGTGGGG
490	500	510	520	530	540
GAAGACTGTTTC	TAATCCTTC	AAACAAATGTC	ACCTTGGAG	CAGTAAACT	GCTCCCTTT
550	560	570	580	590	600
ICCCATGAGA	GATGACAAGC	ATGCCCGAGC	AATCATTCT	TGAAAGCGGA	TGCCCGGTGA
610	620	630	640	650	660
GAGAGGATT	TGATTGCTG	AAGGGTCAGC	CAAGTTAAGC	CAGTTCTC	CTCATTTCTT

ENCHAINEMENT XXXIII : fragment 2 (suite)

670	680	690	700	710	720
CCCTGGCTGG	AGGTTTGAT	GGGGTGTGAT	GTGGTTGAAC	TGAACCCACT	TAGAAACTG
730	740	750	760	770	780
TCAAGGTTT	CTGGACTCTC	AGGTGTGCCG	TCTCACATT	GGTCTGCTAC	AGCAGGTGCT
790	800	810	820	830	840
TCAAGGCTTT	CTTCCTGCCAA	GATTCTTGTG	TTTTTATTATA	TGATGTTTTC	TTTATGTTG
850	860	870	880	890	900
TGTGTGTG	TGTGTGTG	TGTGTGTG	TGTGTGTAC	TTTTTATTCT	AACAAACCTG
910	920	930	940	950	960
TGACCCCTGGG	GTAAAGACT	GAGTGAAGCT	AGAAGGATTA	GAGTCAAAAG	AATTTCGCCA
970	980	990	1000	1010	1020
TTTGGCCAAAT	AGCATCCCC	CACCTCCTGA	CATATCGATT	TTTTTCTAG	ATCCCTTCC
1030	1040	1050	1060	1070	1080
CCC'TGCCACT	CCCCTCCCC	CAACACACAC	ACACTTTCT	CTTTCCTCCT	TTTCTCTCCT
1090	1100	1110	1120	1130	1140
TTCCTCCCTT	GCTTCTCTCC	CCTCCCTCTC	AACACATTCA	ATGAGTGCC	TAAACGGTGA
1150	1160	1170	1180	1190	
CAGCTTGCA	TGTGCTTCCC	TCATGACTAA	ACCCCTGGCC	TTCCTGCCAAAT	CCCTGGCAG

ENCHAINEMENT XXXIII : fragment 3

10	CTGCAGGCAT	CCCGTAAGGA	CCCACCGCT	GCAGCCCTGG	TGGAACGGT	50	60
70	GAGGATGGTG	GGGAGTGGTG	GTGTCTTCGT	CCTGGGAGAA	GGCAGAACAA	110	120
130	GAAACGGCG	TTTCCTTCCC	ACGGGCTCGA	GGGAGCCCTG	GTCCTGGCC	170	180
190	ACCCAGCCCC	TCCCCACCCCT	CTGGGAAAG	CCAGTCGCCA	CACACAGGCA	230	240
250	CCCCGGCCG	GCCCTAAGGA	GAGCAGCACC	CACAGCCAAT	TGCC	280	

ENCHAINEMENT XXXIV

10	20	30	40	50	60
CGAATTTC	AGGAATTCC	GCTGTTGCC	TCTTCAGCTA	CCTACTTCCT	AAAAGGATG
70	80	90	100	110	120
TATGTCAGTG	GACAGAACAG	GGCAAACTTA	TTCGAAAAG	AAATAAGAAA	TAATTGCCAG
130	140	150	160	170	180
TGTGTTATA	ATGATATGA	ATCAGGAGTG	GTGCGAAGAG	GATAGGGAA	AAAAAAATTCT
190	200	210	220	230	240
ATTGGTGCT	GGAAATACTG	CGCTTTTCTT	TTTCCTTTT	TTTTTTTCT	GGAGGCTGGAA
250	260	270	280	290	300
GTGTGCCAGC	TTTTCAGAC	GGAGGAATGC	TGAGTGTCAA	GGGGTCAGGA	TCAATCCGGT
310	320	330	340	350	360
GTGAGTTGAT	GAGGCAGGAA	GGTGGGGAGG	AATGCGAGGA	ATGTCCTGT	TTGTGTAGAC
370	380	390	400	410	420
TCCATTCA	TCATTGGCA	GCGCCGCC	CGGAGCGTA	AAAAGCCTC	GGCCGCCCGC
430	440	450	460	470	480
CCCAAACTCA	CACAAACAACT	CTTCCGCTGA	GAGGAGACAG	CCAGTGCAG	TCCACCCCTCC
490	500	510			
AGCTCGACGG	CAGCCCCC	GGCCGAGAGC	CCCGA		

ENCHAINEMENT XXXV

10	20	30	40	50	60
GTCGAGTGCT	GTGTTCAAGTT	TTGGGCCCT	CACTACAAGA	CATCGAGGCC	ATGGAGTGTG
70	80	90	100	110	120
TCCAGAGAAG	GGCACGAGGT	GGTGAGGAGT	CTGGAGCACA	TGTTTATG	GAAGCAGCTG
130	140	150	160	170	180
AGGAAGTGG	GATTGTTCAAG	TCCGGAGAGG	CTCAGGGAAA	ACATTATTGC	TCTTTAAAAA
190	200	210	220	230	240
TCCCCTGGAAAG	GAGGGTTGTGG	TGAGGTGGAG	GTCGGCCCT	GCTCCCAGGT	ATCAGTGATA
250	260	270	280	290	300
CGATGAGGG	GAACGTGCTT	AAATTATGCC	AGGGGAGTTT	CAGTTGGAT	ATCAGGAACA
310	320	330	340	350	360
ATTTTTTTC	TCCAAAAAAT	TGGTGAGGTA	CTGCCACAGT	CTGCCAGCG	AGGGGGAAATC
370	380	390	400	410	420
ACCATCCCTG	GAGATGTTCA	GGAAACGTGT	AGATGTGGCA	CTGAGGGATG	TGGTTTAGTG

ENCHAINEMENT XXXV (suite)

430	440	450	460	470	480
AGAATGGTAG	GGATGGGTG	ATGGTGGAC	TAGATTAGCT	TAGGGATCTT	TCCAGTCATA
490	500	510	520	530	540
ACGATCCTGT	GATCCTACGA	TCCTAAGGCG	CCGGCCCCAG	CGGAGCAGAC	CCGCAGGGCTT
550	560	570	580	590	600
CAGCCCCGGA	GCCCCGGCG	CGCGTCGGGA	CGGGGCAGG	GCCGGGCACC	GCCGGGCAGG
610	620	630	640	650	660
TGGGGAGCA	CAACGGGGAG	CGGAGCGTAG	GGCCCTGCC	GGCTCCAGCT	CCCCGGCTCC
670	680	690	700	710	720
GTCCCCGGCT	GCCGGTGGCG	GGGGGTGAGG	AGGGGGGG	GGGGGGGG	GTCCCTACCG
730	740	750	760	770	780
GCCTCTATAT	AAGGGGGCGC	AATGGCTTTC	CCGCCAGAGC	CGAGGGCGC	GGGGGGTCA
790	ACGGCCCCGA	CT			

REVENDICATIONS

5 1/ Séquences de nucléotides, caractérisées en ce qu'elles renferment un enchaînement de nucléotides capable de s'hybrider, dans des conditions stringentes (50 % de formamide, 5XSCC) avec une ou plusieurs séquences du gène nov de poule dont l'ADNc présente l'enchaînement de nucléotides (I) et plus spécialement avec l'enchaînement 10 (II).

15 2/ Séquences de nucléotides selon la revendication 1, caractérisées en ce qu'elles sont formées par, ou qu'elles comprennent, un enchaînement de nucléotides capable de s'hybrider, dans les conditions stringentes de la revendication 1, avec au moins une partie du deuxième exon du gène nov de poule qui comprend la séquence nucléotidique (III).

20 3/ Séquences de nucléotides selon la revendication 2, caractérisées en ce qu'elles comportent l'information génétique pour coder pour une protéine renfermant une séquence ayant une homologie d'au moins 70 % avec le fragment de protéine correspondant au deuxième exon du gène 25 nov de poule, ce fragment présentant la séquence d'acides aminés (IV).

30 4/ Séquences de nucléotides selon l'une des revendications précédentes, caractérisées en ce qu'elles comprennent au moins une partie d'un fragment PstI d'environ 600 pb tel qu'obtenu à partir d'un sous-clone plasmidique dérivé d'un clone recombinant isolé d'une banque d'ADN de placenta humain, la carte de restriction enzymatique du clone recombinant ainsi que du sous-clone 35 plasmidique dérivé renfermant la séquence nucléotidique étant représentée sur la figure 2A.

5/ Séquences de nucléotides selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisées en ce qu'elles comportent l'information génétique pour coder pour une séquence d'acides aminés présentant l'enchaînement V.

5

6/ Séquences de nucléotides selon l'une des revendications 1 à 5, caractérisées en ce qu'elles comportent au moins une partie du l'enchaînement nucléotidique (VI), plus spécialement de l'enchaînement (VII).

10

15 7/ Séquences de nucléotides selon la revendication 1, caractérisées en ce qu'elles sont capables de s'hybrider, dans les conditions stringentes définies dans la revendication 1, avec au moins une partie du troisième exon du gène nov de poule qui comprend la séquence nucléotidique (VIII).

20

8/ Séquences de nucléotides selon la revendication 7, caractérisées en ce qu'elles comportent l'information génétique pour coder pour une protéine ayant une homologie d'au moins 70 % environ avec le fragment de protéine potentiel correspondant au troisième exon du gène nov de poule répondant à la séquence (IX).

25

30 9/ Séquences de nucléotides selon la revendication 7 ou 8, caractérisées en ce qu'elles comprennent au moins une partie d'un fragment PstI d'environ 700 pb, tel qu'obtenu à partir d'un sous clone plasmidique dérivé d'un clone recombinant isolé d'une banque d'ADN de placenta humain, la carte de restriction enzymatique du clone recombinant ainsi que celle du sous-clone plasmidique dérivé renfermant la séquence nucléotidique en question étant représentées sur la figure 2A.

35

10/ Séquences de nucléotides selon l'une des revendications 7 à 9, caractérisées en ce qu'elles

comportent l'information génétique pour coder pour une protéine ayant la séquence (X) en acides aminés.

5 11/ Séquences de nucléotides selon l'une des revendications 7 à 10, caractérisées en ce qu'elles comportent au moins une partie de l'enchaînement nucléotidique (XI), plus particulièrement, l'enchaînement nucléotidique (XII).

10 12/ Séquences de nucléotides selon la revendication 1, caractérisées en ce qu'elles sont formées par, ou qu'elles comprennent, un enchaînement capable de s'hybrider, dans les conditions stringentes données dans la revendication 1, avec au moins une partie du quatrième exon 15 du gène nov de poule, qui comprend l'enchaînement (XIII).

20 13/ Séquences de nucléotides selon la revendication 12, caractérisées en ce qu'elles sont capables de coder pour le fragment de protéine ayant une homologie d'au moins 86 % avec le fragment de protéine potentiel correspondant au quatrième exon du gène nov de poule répondant à l'enchaînement (XIV) en acides aminés.

25 14/ Séquences de nucléotides selon la revendication 12 ou 13, caractérisées en ce qu'elles comportent l'information génétique pour coder pour une protéine ayant la séquence (XV) en acides aminés.

30 15/ Séquences de nucléotides selon l'une des revendications 12 à 14, caractérisées en ce qu'elles sont formées par ou qu'elles comprennent l'enchaînement nucléotidique (XVI).

35 16/ Séquences de nucléotides selon la revendication 1, caractérisées en ce qu'elles sont capables de s'hybrider, dans les conditions stringentes définies dans la revendication 1, avec au moins une partie du

premier exon du gène *nov* de poule qui comprend la séquence nucléotidique (XVIII).

17/ Séquences de nucléotides selon la revendication 11, caractérisées en ce qu'elles comportent l'information génétique pour coder pour une protéine ayant une homologie d'au moins 30 % environ avec le fragment de protéine potentiel correspondant au premier exon du gène *nov* de poule, ce fragment présentant l'enchaînement (XIX) 10 en acides aminés.

18/ Séquences de nucléotides selon l'une des revendications 16 ou 17, caractérisées en ce qu'elles comportent l'information génétique pour coder pour une 15 protéine ayant la séquence (XX) en acides aminés.

19/ Séquences de nucléotides selon l'une des revendications 16 à 18, caractérisées en ce qu'elles comportent au moins une partie de l'enchaînement 20 nucléotidique (XXI).

20/ Séquences de nucléotides selon la revendication 1, caractérisées en ce qu'elles sont capables de s'hybrider, dans les conditions stringentes définies 25 dans la revendication 1, avec au moins une partie des troisième et quatrième exons du gène *nov* de poule qui comprennent la séquence nucléotidique (XXII).

21/ Séquences de nucléotides selon la revendication 20, caractérisées en ce qu'elles comportent l'information génétique pour coder pour une protéine ayant 30 la séquence (XXIII) en acides aminés.

22/ Séquences de nucléotides selon l'une des revendications 20 à 21, caractérisées en ce qu'elles sont formées par ou qu'elles comprennent un enchaînement capable 35 de s'hybrider dans les conditions stringentes définies dans la revendication 1, avec au moins une partie du troisième

exon du gène nov de poule qui comprend la séquence nucléotidique (XXII).

5 23/ Séquences de nucléotides selon l'une des revendications 20 à 22, caractérisées en ce qu'elles comportent l'information génétique pour coder pour une protéine ayant une homologie d'au moins 60 % environ avec le fragment de protéine potentiel correspondant au troisième exon du gène nov de poule répondant à la séquence 10 (XXIII) en acides aminés.

15 24/ Séquences de nucléotides selon l'une des revendications 20 à 22, caractérisées en ce qu'elles comportent l'information génétique pour coder pour une protéine ayant la séquence (XXIV) en acides aminés.

20 25/ Séquences de nucléotides selon l'une des revendications 20 à 24, caractérisées en ce qu'elles comportent au moins une partie de l'enchaînement nucléotidique (XXV), plus particulièrement, l'enchaînement nucléotidique (XXVI).

25 30 26/ Séquences de nucléotides selon l'une des revendications 20 à 25, caractérisées en ce qu'elles sont formées par ou qu'elles comprennent un enchaînement capable de s'hybrider dans les conditions stringentes données dans la revendication 1 avec au moins une partie du quatrième exon du gène nov de poule, qui comprend l'enchaînement de nucléotides (XXVII).

35 27/ Séquences de nucléotides selon la revendication 14, caractérisées en ce qu'elles sont capables de coder pour le fragment de protéine ayant une homologie d'au moins 86 % avec le fragment de protéine potentiel correspondant au quatrième exon du gène nov de poule répondant à l'enchaînement (XXVIII) en acides aminés.

28/ Séquences de nucléotides selon la revendication 26 ou 27, caractérisées en ce qu'elles comportent l'information génétique pour coder pour une protéine ayant la séquence (XXIX) en acides aminés.

5

29/ Séquences de nucléotides selon l'une des revendications 26 à 28, caractérisées en ce qu'elles sont formées par ou qu'elles comprennent l'enchaînement nucléotidique (XXX).

10

30/ Les ARN et séquences complémentaires des séquences selon l'une quelconque des revendications 1 à 29.

31/ Vecteurs recombinants de clonage et 15 d'expression, capables de transformer une cellule hôte appropriée, comportant au moins une partie d'une séquence de nucléotides selon l'une quelconque des revendications 1 à 30 sous le contrôle d'éléments de régulation permettant son expression dans la cellule hôte.

20

32/ Souches de microorganismes transformées ou transfectées, caractérisées en ce qu'elles comportent une séquence de nucléotides selon l'une quelconque des revendications 1 à 30 ou encore un vecteur recombinant 25 selon la revendication .

33/ Les protéines correspondant aux séquences nucléotidiques selon l'une quelconque des revendications 1 à 30.

30

34/ Les anticorps polyclonaux et monoclonaux caractérisés en ce qu'ils reconnaissent spécifiquement une protéine selon la revendication 33, ou un fragment d'une telle protéine.

35

35/ Sonde de détection, caractérisée en ce qu'elle comprend tout ou partie des séquences de nucléotides selon l'une des revendications 1 à 30.

36/ Procédé de dépistage in vitro de la présence éventuelle dans un échantillon biologique de séquences de nucléotides complémentaires de celles selon l'une 5 quelconque des revendications 1 à 30, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

- la mise en contact de l'échantillon biologique avec une sonde nucléotidique selon la revendication 35 dans 10 des conditions permettant la production d'un complexe d'hybridation formé entre ladite sonde et ladite séquence de nucléotides,

15 - la détection du complexe d'hybridation, et

20 - le cas échéant l'amplification, avant l'étape de mise en contact, des séquences de nucléotides selon l'une quelconque des revendications 1 à 30 susceptibles d'être contenues dans l'échantillon, à l'aide d'amorces susceptibles respectivement de se lier, d'une part à l'extrémité 5' d'un brin de ladite séquence de nucléotides et, d'autre part, à l'extrémité 3' de l'autre brin de ladite séquence de nucléotides,

25 37/ Kit pour la mise en oeuvre d'une méthode de dépistage in vitro de la présence éventuelle dans un échantillon biologique de séquences complémentaires des séquences selon l'une quelconque des revendications 1 à 18 caractérisé en ce qu'il comprend :

30 - une quantité déterminée d'une sonde nucléotidique selon la revendication 35,

35 - un milieu approprié à la formation d'une réaction d'hybridation entre la séquence à détecter, et la sonde, et, avantageusement,

- des réactifs permettant la détection des complexes d'hybridation formés entre la séquence de nucléotides et la sonde lors de la réaction d'hybridation.

5 38/ Procédé de dépistage in vitro de la présence dans un échantillon biologique des protéines selon la revendication 33, caractérisé en ce qu'il comprend :

10 - la mise en contact de l'échantillon avec un anticorps selon la revendication 34, dans des conditions permettant la production d'un complexe immunologique formé entre tout ou partie des protéines et cet anticorps, et

- la détection du complexe immunologique.

15 39/ Kit pour la mise en oeuvre d'une méthode de dépistage in vitro de la présence éventuelle de protéines selon la revendication 21 dans un échantillon biologique, caractérisé en ce qu'il comprend :

20 - une quantité déterminée d'un anticorps selon la revendication 33,

25 - avantageusement un milieu approprié à la formation d'une réaction immunologique entre au moins une partie d'une protéine et l'anticorps et, avantageusement,

30 - des réactifs permettant la détection des complexes immunologiques formés entre au moins une partie de la protéine recherchée et l'anticorps lors de la réaction immunologique.

35 / Procédé de détection dans un échantillon biologique de protéines selon la revendication 33, ou de leurs fragments, caractérisé par la mise en contact des protéines de l'échantillon, ou de leurs fragments, avec un IGF portant un groupe marqueur et le dosage de la quantité de produit fixé.

41/ Utilisation en tant qu'amorces dans des techniques d'amplification d'ADN, de type PCR, de deux amplimères d'environ 15 nucléotides, compris dans l'une des 5 séquences selon l'une quelconque des revendications 1 à 18, et distantes de 200 à 250 nucléotides environ, l'une des séquences étant capable de se lier à l'extrémité 5' d'un brin de la séquence à amplifier et la deuxième séquence à l'extrémité 3' de l'autre brin.

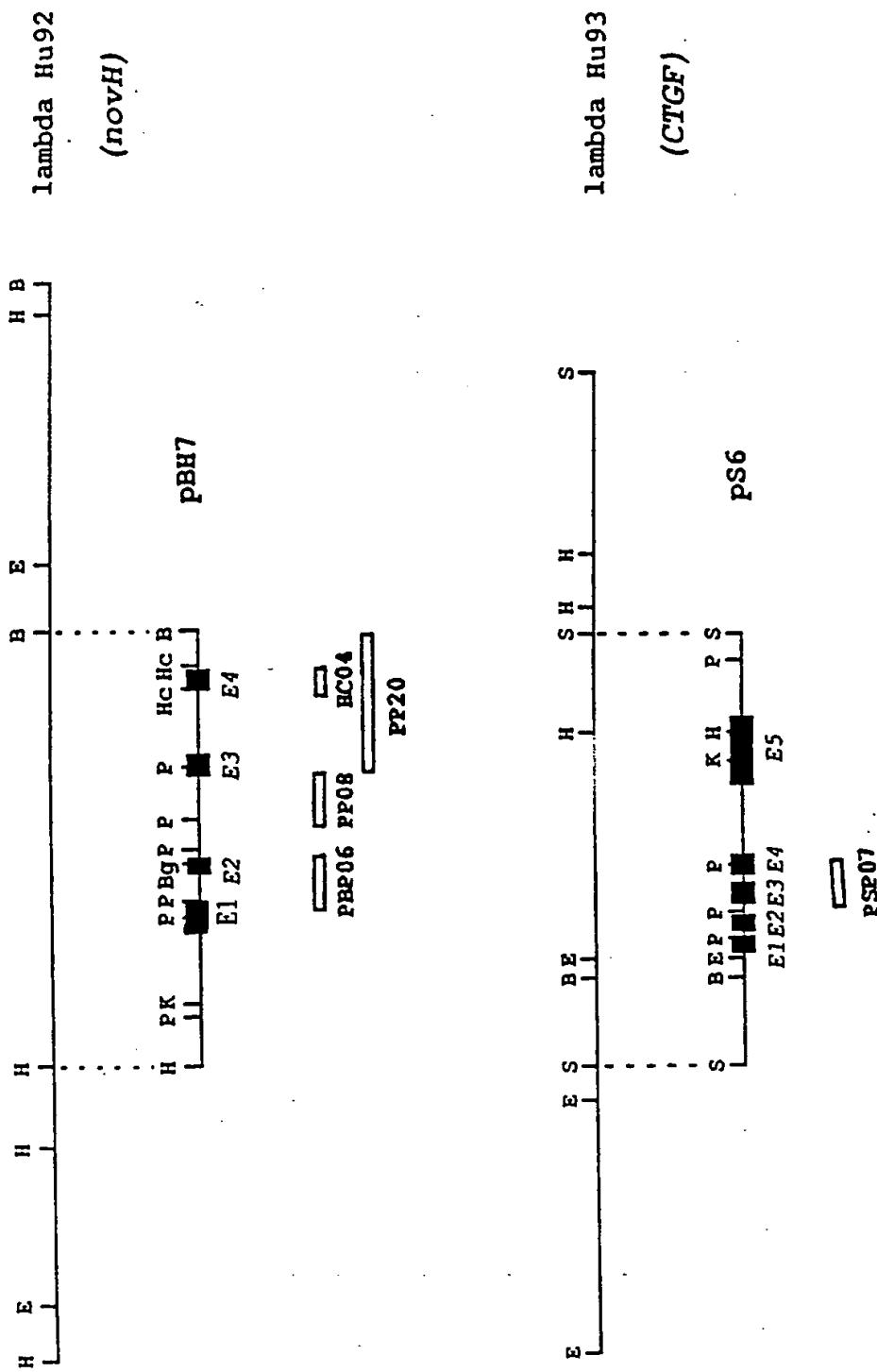
FIGURE 1

nov mRNA

FIGURE 1 (suite)

ATG AAA GCT CGT TTT GAA TAC AAG AAC TGC ACC AGT GTG CAG ACT TAC CCT CGT TAC TGT GGC CTC TGC AAT GAT GGG CGA TGC	905
H K V R F E Y K N (C) T S V Q T Y K P R Y (C) G L (C) N D G R (C)	
TGT ACC CCA CAC ANC ACC AAA ACG ATT CAA GTT GAG TTC CGC TGT CCT CAG GGC AAA TTC CTA AAA AAG CCA ATG ATG TGT ATC AAT ACC	995
(C) T P H N T K T I Q V E F R (C) P Q G K F L K P M M L I (N) T	
TGT GTC TGT CAT GGT CCT CAG AGT AAC AAT GCT TTC TTC CAG CCA TTA GAT CCC ATG TCT AGT GAA GCA AAA ATA TGAATGTATA	1087
(C) V (C) H G N (C) P Q S N A F F Q P L D P M S S E A K I *	
GTGTAGGTGGCCCAAAAGGTATGTAGTTGTACAAAACCTGNNCCACACATCAGGTGAAATATATTGCAATTATGCTGAGATTTTCTGAGTGTGCTTTT TTTCTGTAGTTACTAAATACCTCATGACGTTACCCCTCAATTAGTCCTTATTCATTTGAAAGGAATTTCATTTGACCTTAAACAGTCTGAGTGTGCTTTT	1206
GAT TACAAAGCTAACAGCTAGCTCTCTGTAGTTAGAGGACCTGCACTGATTTCAGTAGGCCATTAGACTGGGCTTTTAAATAGGATTCTTGGGAAATGCACTGAAAC TCACAAAAGCTTCCAGGTTCACTTGAAATATTGTAACATTGCTATCTTCAAGCTTCAACAGCCCTCTTCAAGCTTCAACACTTACAGCTTCAAGCTTCAAC AATCTCTTGGCTTATAAAGTATCTTCTATCTGACCTCTGTGACCTTCTGTAGGTATTAGTTCAGGGATTAGTTGACATAGCTCAAGCTTCAACAGCT TTCAGATAGCTGATAACAAATTCTCATTCAGTGTAGCTTATTAGCAGGCTTAAATCCATTTCTGAACTTAAATTACTAATCTGATCAGATGGCTTCACT CTTGTAGTGCACAAATTTCTTAAATTCTGTAATTCAGATGGCTTCACTTACTAGAAAGATGTTTATGTAAATGAAACTGTATAATTTGTAATATAACT	1325
TITATTAGGTAAAATTTCTGTAATTCAGATGGCTTCACTTACTAGAAAGATGTTTATGTAAATGAAACTGTATAATTTGTAATATAACT	1444
TTTGTAGTGCACAAATTTCTGTAATTCAGATGGCTTCACTTACTAGAAAGATGTTTATGTAAATGAAACTGTATAATTTGTAATATAACT	1563
TTTGTAGTGCACAAATTTCTGTAATTCAGATGGCTTCACTTACTAGAAAGATGTTTATGTAAATGAAACTGTATAATTTGTAATATAACT	1682
TTTGTAGTGCACAAATTTCTGTAATTCAGATGGCTTCACTTACTAGAAAGATGTTTATGTAAATGAAACTGTATAATTTGTAATATAACT	1801
TTTGTAGTGCACAAATTTCTGTAATTCAGATGGCTTCACTTACTAGAAAGATGTTTATGTAAATGAAACTGTATAATTTGTAATATAACT	1920
TTTGTAGTGCACAAATTTCTGTAATTCAGATGGCTTCACTTACTAGAAAGATGTTTATGTAAATGAAACTGTATAATTTGTAATATAACT	1975

FIGURE 2



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/FR 92/00589

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl.5: C12N15/12; C07K15/00; C12P21/08; C12Q1/68
 C12N1/21; G01N33/53; G01N33/574; C12P19/34

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl.5: C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	COMPTEES RENDUS DE L'ACADEMIE DES SCIENCES vol. T313, No. III, September 1991, PARIS, FRANCE pages 345 - 351 C. MARTINERIE ET BERNARD PERBAL 'Expression of a gene encoding a novel potential IGF binding protein in human tissues' see the whole document ---	1-41
O, X	Proceedings of the 82nd Annual Meeting of the American Association for Cancer Research Vol. 32 see page 312, abstract No. 1857 & 82nd Annual Meeting of the AAC May 15-18, 1991, Houston, TX, USA " Expression of an embryonic gene (nov) in nephroblastomas" B. Perbal et al. ---	1-41
	-/-	

 Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

- * Special categories of cited documents:
- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

16 October 1992 (16.10.92)

Date of mailing of the international search report

2 November 1992 (02.11.92)

Name and mailing address of the ISA/
European Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/FR 92/00589

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	<p>MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY vol. 12, No. 1, January 1992, WASHINGTON, D.C., USA pages 10 - 21 V. JOLIOT ET AL. 'Proviral rearrangements and overexpression of a new cellular gene (Nov) in myeloblastosis-associated virus type 1 induced nephroblastomas' see the whole document -----</p>	1-41

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No

PCT/FR 92/00589

I. CLASSEMENT DE L'INVENTION (si plusieurs symboles de classification sont applicables, les indiquer tous) ⁷

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

CIB 5 C12N15/12;	C07K15/00;	C12P21/08;	C12Q1/68
C12N1/21;	G01N33/53;	G01N33/574;	C12P19/34

II. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée⁸

Système de classification	Symboles de classification
CIB 5	C07K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où de tels documents font partie des domaines sur lesquels la recherche a porté

III. DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS¹⁰

Catégorie ⁹	Identification des documents cités, avec indication, si nécessaire, ¹² des passages pertinents ¹³	No. des revendications visées ¹⁴
P, X	COMPTES RENDUS DE L'ACADEMIE DES SCIENCES vol. T313, no. III, Septembre 1991, PARIS, FRANCE pages 345 - 351 C. MARTINERIE ET BERNARD PERBAL 'Expression of a gene encoding a novel potential IGF binding protein in human tissues' voir le document en entier ---	1-41
O, X	Proceedings of the 82nd Annual Meeting of the American Association for Cancer Research Vol 32 voir page 312, Abrégé No. 1857 & 82nd Annual Meeting of the AAC May 15-18, 1991, Houston, TX, USA " Expression of an embryonic gene (nov) in nephroblastomas" B. Perbal et al. ---	1-41 -/-

⁹ Catégories spéciales de documents cités:¹¹

- "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée
- "T" document ultérieur publié postérieurement à la date de dépôt international ou à la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- "X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive
- "Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier.
- "A" document qui fait partie de la même famille de brevets

IV. CERTIFICATION

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

16 OCTOBRE 1992

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

02.11.92

Administration chargée de la recherche internationale

OFFICE EUROPEEN DES BREVETS

Signature du fonctionnaire autorisé

VAN PUTTEN A.J.

III. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS ¹⁴		(SUITE DES RENSEIGNEMENTS INDIQUES SUR LA DEUXIEME FEUILLE)
Catégorie ¹⁵	Identification des documents cités, ¹⁶ avec indication, si nécessaire des passages pertinents ¹⁷	No. des revendications visées ¹⁸
P, X	<p>MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY vol. 12, no. 1, Janvier 1992, WASHINGTON, D.C., USA pages 10 - 21 V. JOLIOT ET AL. 'Proviral rearrangements and overexpression of a new cellular gene (Nov) in myeloblastosis-associated virus type 1 induced nephroblastomas' voir le document en entier -----</p>	1-41